

TRABAJO DE FIN DE GRADO

APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE IMAGEN PARA LA ESTIMACIÓN DE BIOMASA ZOOPLANCTÓNICA

Departamento de Biología

Doble Grado Ciencias Ambientales y Ciencias del Mar



Autor: Pablo Corrales Terciado

Tutor: Juan Ignacio González Gordillo

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la confianza y el empeño de mi tutor, Nacho. Desde el principio ha sido un orgullo y también una responsabilidad formar parte de su departamento, aunque fuera mediante la pequeña función que he desempeñado y de la cual espero que esté tan satisfecho como yo. Ha tenido la paciencia necesaria para guiarme y explicarme durante estos 2 años y me ha brindado una oportunidad que espero haber aprovechado. Como otra parte fundamental de la familia que hay allí formada, también tengo que agradecer a María José y a Mariu los ratos amenos en el laboratorio y las buenas sobremesas que hemos pasado juntos.

A mis padres por el apoyo y la tenacidad por la que han creído en mí, incluso cuando yo no creía, durante todos estos años. Gracias por vuestra paciencia y vuestra confianza, tantas veces puesta a prueba y por saber hacerme ver.

A mis amigos, aquellos que han compartido horas conmigo tanto en las aulas como fuera de ellas, aquellos que me aceptaron cuando era nuevo y aquellos que aceptarán cuando sea viejo.

A mi primo, porque cualquier gesto de aprecio y agradecimiento contigo se queda corto, porque siempre te recordaré y siempre te llevaré conmigo vaya donde vaya, a Ávila, a Cádiz, a Navares. Gracias porque una parte (buena) de lo que soy, es por ti.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MATERIAL Y MÉTODO.....	14
2.1. Obtención y pretratamiento de las muestras.....	15
2.2. Análisis de las muestras de zooplancton.....	16
2.2.1. Preparación de las muestras y toma de imágenes.....	16
2.2.2. Análisis de imagen.	20
2.2.3. Análisis gravimétrico. Estima de la biomasa mediante Peso seco.....	21
2.2.4. Análisis estadístico. Obtención de las relaciones talla-peso.....	23
3. RESULTADOS.....	25
4. DISCUSIÓN.....	37
5. CONCLUSIÓN.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43

RESUMEN

Se han analizado un total de 2995 especímenes de zooplancton provenientes del Sureste del Océano Atlántico Sur, Océano Índico Sur, Mar de Tasmania y Oeste del Océano Pacífico Sur, obtenidos durante la expedición Malaspina 2010. Se ha establecido relación a partir de modelos de regresión entre la talla y la biomasa como peso seco para cada uno de los 31 taxones analizados, con la finalidad de proponer una metodología no destructiva para la estimación de la biomasa. La talla (área) de cada organismo se ha obtenido mediante análisis de imágenes, haciendo uso del software libre ImageJ. La biomasa de los individuos se ha medido a partir de los procedimientos estandarizados de peso seco.

Tras la aplicación del proceso metodológico y el análisis estadístico de los resultados, se han agrupado los taxones en cuatro categorías diferentes en función de la calidad y la representatividad de los ajustes obtenidos. Del total de taxones analizados, los modelos de regresión presentan $R^2 > 0.6$ y $p\text{-value} < 0.05$ para 15 de ellos, entre los que destacan Atlantidae, Limacinidae y *Pontellina plumata* por su alto grado de correlación y significación ($R^2 > 0.9$; $p\text{-value} < 0.001$). Se han definido otros 8 taxones con valores de $R^2 < 0.6$ y $p\text{-value} < 0.05$ y finalmente se han obtenido ajustes de baja potencia para 8 taxones más.

Se han podido observar diferencias intra e interespecíficas entre los organismos estudiados, dependiendo así mismo de la estación de muestreo de procedencia. También se han comparado con antecedentes bibliográficos encontrando similitudes en las pendientes de las curvas de los modelos potenciales de Euphausiacea y Ostracoda de este estudio y poblaciones de las Islas Canarias y la Península Antártica.

Por todo ello, a partir de las relaciones talla-peso, se ha establecido un procedimiento metodológico que no conlleva la destrucción de las muestras, basado en el análisis de imagen, capaz de estimar la biomasa de especies zooplanctónicas.

ABSTRACT

2995 plankton organisms coming from the Southwest South-Atlantic Ocean, the South-Indic Ocean, the Tasmania Sea and the West of the Pacific Ocean were analyzed. Samples were obtained during the Malaspina's 2010 expedition. Through the use of regression models, a relation was established between the size and the biomass, as dry weight, for each one of the taxa analyzed, with the purpose of proposing a non-destructive methodology to estimate the biomass. Size was obtained through image analysis, using ImageJ free software. Biomass was measured using the dry weight standard method.

After applying the two different methods and seeing the result of the statistical analysis, taxa were grouped in 4 different categories depending on the quality and the accuracy of their regression values. Of all taxa analyzed, regression models present $R^2 > 0.6$ and $p\text{-value} < 0.05$ for 15 of them, being Atlantidae, Limacinidae y *Pontellina plumat* the ones that stand out because of their high correlation and good significance rates ($R^2 > 0.9$; $p\text{-value} < 0.001$). Another 8 taxa have shown $R^2 < 0.6$ y $p\text{-value} < 0.05$ and finally low-quality adjustments were obtained for another 8 taxa.

Depending on the sample origin, intra and interspecific differences have been noted. Results have been compared with bibliography, founding similarities between the slopes of the background studies from Islas Canarias and Antarctic Peninsula, and Euphausiacea and Ostracoda slopes from this study.

From those size-weight relations, a methodological procedure was established which does not entail the destruction of the samples, thanks to image analysis, being able to estimate the biomass of different zooplanktonic species.

1. INTRODUCCIÓN

A medida que el impacto y la presión generados por el ser humano sobre los ecosistemas marinos se incrementa y se hace más patente día a día, surgen nuevas iniciativas con la finalidad de monitorear este medio cada vez más sensible (Large et al., 2015). Desde la Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de junio de 2008, se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino. La denominada Directiva Marco sobre la Estrategia Marina incentiva y fomenta el estudio de estos ecosistemas con miras a su protección y preservación, sumando estrategias de prevención y reducción del impacto antropogénico sobre el medio marino. Como parte esencial de estos ecosistemas, el zooplancton juega un papel fundamental a la hora de entender las intrincadas conexiones que se establecen en las redes tróficas del sistema pelágico conformando, i) la base alimentaria de gran cantidad de organismos marinos (Castro-Longoria et al., 2001) y ii) representando el compartimento trófico intermedio que actúa como nexo de unión entre productores primarios y el necton. El zooplancton es un mediador imprescindible en los ciclos biogeoquímicos marinos y un buen indicador ecológico que permite conocer las condiciones medioambientales del medio en el que habita (Benfield et al., 2007). Para poder llegar a entender su importancia y contribución a los flujos energéticos, así como para desarrollar modelos ecosistémicos o modelos predictivos de impacto climático, es de vital importancia estimar la biomasa de estos organismos (Halliday, 2001).

Atendiendo a esta necesidad, se diseñó el presente estudio con la idea de establecer una metodología alternativa al método clásico (incineración de las muestras) que: i) evitase la destrucción de las muestras; ii) redujera los tiempos de procesado y costes de análisis; iii) se obtuvieran simultáneamente de cada organismo otra serie de parámetros de interés, como son el área, perímetro, diámetro, etc., además del peso del ejemplar, útiles para la interpretación de los resultados.

Metodologías actuales para la estima de biomasa

Existen diversas metodologías desarrolladas con la finalidad de medir de manera directa o indirecta la biomasa, o cantidad de materia orgánica, de una muestra de plancton, así como la biomasa individual de cada uno de los organismos. Un primer bloque metodológico incluiría tanto métodos volumétricos como gravimétricos. Estos primeros

inferen la biomasa a partir de la sedimentación de la muestra y el desplazamiento de un volumen previamente conocido (Ahlstrom & Thraillkill, 1963). Estas metodologías son relativamente sencillas y no requieren equipos excesivamente complejos, pero presentan algunas limitaciones, estando restringidas por su capacidad para discriminar entre materia biológica y detrítica y ofreciendo una precisión relativamente baja (Halliday, 2001). Con respecto a las metodologías gravimétricas que inferen la biomasa de las muestras a partir de mediciones de la propia masa de los organismos, es sabido que el sesgo metodológico asociado disminuye cuando se elimina totalmente el contenido acuoso de los organismos (Postel et al., 2000). Estas técnicas incluyen la medición por peso seco (Lovegrove, 1966), el cálculo de carbono orgánico o valores caloríficos en base al peso seco libre de ceniza (Wiebe et al., 1975), análisis de carbono elemental o nitrógeno.

La dificultad asociada a la clasificación de los diferentes niveles tróficos y la necesidad de separar la materia orgánica particulada y el detritus de los componentes vivos del plancton se suman a que, la aplicación de la mayoría metodologías analíticas gravimétricas directas, conlleva la destrucción de las muestras. Esto constituye una pérdida de valiosa información que podría ser utilizada en futuros estudios. El tiempo y el costo asociados a la obtención de los organismos instan a desarrollar y aplicar metodologías no destructivas que mantengan la integridad estructural de las muestras, con el objetivo de poder ser utilizadas para diferentes fines (Hernández-León & Montero, 2006). Es por ello que uno de los objetivos de este trabajo es proveer de una serie de factores de conversión gracias a los cuales no sea necesario utilizar ninguna de estas metodologías destructivas con las muestras para estimar su biomasa.

La aplicación de procedimientos no destructivos con el fin de evitar la pérdida irreversible de las muestras se incluiría en un segundo bloque metodológico, que comprendería las estimaciones de biomasa basadas en el principio del contador Coulter (Spohr, 1996), contadores ópticos y sistemas que captan la luz dispersada por cada uno de los organismos a medir (Freimann, 1996) y técnicas analíticas para la estimación del volumen biológico de una muestra planctónica basadas en sistemas acústicos, como los desarrollados por Pieper & Holliday (1984) o Costello et al. (1989). En relación al primer bloque, también existen métodos gravimétricos no destructivos, que suponen que la biomasa zooplanctónica se estime a partir de peso húmedo, factores de conversión para calcular materia o carbono orgánico y el desarrollo de relaciones talla-peso, entre otras (Strathmann, 1967; Le Borgne, 1975; Wiebe et al., 1975; Postel et al., 2000; Halliday,

2001; Alcaraz et al., 2003; Hernández-León & Montero, 2006; Lehetle & Hernández-León, 2009; Ohman & Romagnan, 2016).

En el mejor de los casos, la biomasa zooplanctónica debe ser estimada a partir de material fresco, es decir, a partir de organismos vivos *in-situ* o recién capturados (Alcaraz et al., 2003). Sin embargo, el tratamiento de las muestras y el procesamiento de los datos a bordo de los buques oceanográficos es complicado y lleva asociado un coste de tiempo y dinero mayor que si se hace en un entorno controlado en tierra firme. En muchos casos, los especímenes son preservados y almacenados para su posterior análisis en los laboratorios, como es el caso de las muestras recogidas durante la expedición Malaspina 2010 utilizadas en este estudio. Para mantener a los ejemplares en perfecto estado, estos son preservados en frío o introducidos en formol. A pesar de ello, es sabido que ambos métodos añaden fuentes de error e incertidumbre a las mediciones posteriores que se quieran realizar con las muestras ya que producen pequeñas roturas de las paredes celulares de los organismos, la pérdida de fluidos y la lixiviación de sustancias corporales en el fijador circundante (Böttger & Schnack, 1986), disminuyendo la fuerza y representatividad de los resultados analíticos posteriores.

La potencia de los análisis estadísticos basados en las variables medidas para estimar la biomasa depende de cuan adecuada, precisa y exacta sea la metodología analítica utilizada. Incluso cuando el procedimiento se ajusta a las características de la muestra y a los resultados deseados, estos factores suelen sumar fuentes de error como consecuencia de la variabilidad taxonómica y los errores humanos relacionados con el pretratamiento de los ejemplares (Postel et al., 2000). Es posible minimizar gran parte de la variabilidad asociada tanto a los métodos de conservación de las muestras como a los errores citados anteriormente mediante la utilización del análisis de imagen (Lam Hoai, 1991; Billones et al., 1999), constituyendo a la vez una manera no destructiva de procesar las muestras.

El análisis de imagen como metodología alternativa

El uso del análisis de imagen con el propósito de medir e identificar muestras de plancton se remonta a principios de la década de los 70. La primera herramienta de este tipo capturaba la silueta de organismos planctónicos vivos mediante el uso de un flash emitido por una fuente electrónica (Ortner et al., 1979; Edgerton, 1981). La baja precisión

de los sistemas utilizados en aquel momento no permitía más que enumerar e identificar partículas a *grosso modo* (Ortner et al., 1981; Rolke & Lenz, 1984; Estep et al., 1986). Estas técnicas mejoraron a partir de principios de 1990 gracias al creciente desarrollo tecnológico (Bell & Hopcroft, 2008).

A lo largo de la última década, la obtención de datos cuantitativos y cualitativos de muestras zooplanctónicas mediante las técnicas de análisis de imagen ha mejorado considerablemente. El desarrollo de instrumentos y métodos dedicados a este tipo de análisis han convertido estas metodologías en una buena solución operacional capaz de proveer altas frecuencias y resoluciones espaciales para muestras de meso y macro-zooplankton (Romagnan et al., 2015).

Otras metodologías basadas en el análisis óptico automatizan el proceso de obtención de datos, como es el caso de los OPC (Optical Plankton Counter) o los Láser-OPC. En comparación, las técnicas de análisis de imagen proporcionan una capacidad de identificación taxonómica similar, aunque inferior a la obtenida mediante microscopios (Gorsky et al., 2010). A pesar de que su precisión disminuye para altos volúmenes muestrales, como se explica posteriormente, facilitan y agilizan en gran medida la medición del tamaño de los organismos (Colas et al., 2018).

Al igual que las metodologías gravimétricas, el análisis de imagen ofrece mejores resultados en el caso de muestras homogéneas, cuando las características cualitativas del conjunto de organismos se mantienen constantes, es decir, cuando no existe una alta variabilidad taxonómica, presencia de materia no zooplanctónica, detritus, fitoplancton, etc (Alcaraz et al., 2003). Los procedimientos basados en el análisis de imagen también tienen la capacidad de evitar algunas de las fuentes de error debidas a la manipulación de los organismos y a la presencia de material particulado que no sea zooplankton (Alcaraz et al., 2003). Aun así, las estimaciones de biomasa siguen dependiendo de la aplicación, a veces de forma genérica, de factores de conversión. Así mismo, ven disminuida su eficacia cuando se trata de muestras muy heterogéneas, cuando los espectros de tamaño son muy diversos (Billones et al., 1999; Hernández-León & Montero, 2006) o cuando se trabaja con grandes volúmenes de muestra, siendo la resolución de las imágenes otro hándicap a tener en cuenta (Romagnan et al., 2016).

A partir del análisis de imagen, el biovolumen zooplanctónico se estima en función de las variables analizadas mediante varios métodos. Alcaraz et al. (2003) obtiene

dicha estimación a partir de una relación previamente conocida entre el biovolumen total de la muestra y la biomasa de una unidad volumétrica de referencia. Billones et al. (1999) aproxima el volumen asumiendo que la forma del cuerpo del organismo es equivalente a una forma geométrica simple o la suma de varias formas geométricas simples. La utilización de métodos tanto morfométricos como geométricos proporcionan una manera rápida de estimar el volumen de un organismo zooplanctónico, todo ello sin la necesidad de utilizar equipamiento sofisticado y con resultados igualmente satisfactorios para ambos procedimientos (Halliday, 2001). En otros estudios, el volumen fue derivado de una determinación automática del área proyectada por el organismo individual y los parámetros necesarios para calcular el volumen elipsoidal (Alcaraz et al., 2003).

Se ha comprobado que los coeficientes de correlación entre área y peso para diversas especies de organismos zooplanctónicos presentan una mayor fuerza que los obtenidos para longitud-peso o volumen-peso (Hernández-León & Montero, 2006). Esto refuerza la metodología utilizada en el presente trabajo, ya que los factores de conversión han sido obtenidos estableciendo una relación entre la talla (área) individual y el peso seco (materia orgánica) de los organismos.

La estimación de características del zooplancton tales como la biomasa, mediante el análisis de imagen, requiere: i) la utilización de diferentes instrumentos para la toma de fotografías y ii) programas informáticos que permitan procesar las imágenes obtenidas de manera sistemática.

En relación al primer punto, cabe destacar una serie de instrumentos cuya utilización se ha popularizado en el análisis de imagen gracias a las distintas prestaciones que ofrecen. FlowCam (Sieracki et al., 1998), es un instrumento utilizado normalmente para analizar muestras de fitoplancton. Aunque ofrece la ventaja de poder ser utilizado a bordo de los buques oceanográficos (Jenkins et al., 2016) y también puede analizar mesozooplancton cuyo rango de tamaño no exceda 1 mm, presenta dificultades a la hora de procesar muestras con altas concentraciones de organismos y su velocidad de análisis se puede prolongar en demasía dependiendo del ratio de flujo (Colas et al., 2018), todo ello sumado a una escasa calidad de imágenes y alta fragilidad del equipo. ZooScan es actualmente uno de los instrumentos más utilizados del mercado para el análisis de zooplancton (Gorsky et al., 2010). Tiene la capacidad de procesar alrededor de 3000 objetos de hasta 3 muestras diferentes (Romagnam et al., 2016), siendo la rapidez en el procesamiento de las muestras uno de sus principales atributos (Gorsky & Grosjean,

2003). En contraparte, necesita estabilidad absoluta mientras opera, imposibilitando su uso a bordo de buques. Por último, ZooCAM, desarrollado en 2014 para contar y clasificar huevos de peces, ha sido testeado y comparado con ZooSCAN en recientes estudios, obteniendo resultados similares e incluso mejorándolos en lo relativo al conteo de huevos de peces, enumeración y medición de microorganismos $>300\ \mu\text{m}$ (Colas et al., 2018). Se ha comprobado que otros escáneres y cámaras fotográficas son capaces de proveer de información de calidad similar a estos instrumentos especializados, aunque con una velocidad de análisis inferior (Bachiller et al., 2012).

En lo relativo a los programas utilizados, es preciso mencionar el reciente y creciente uso de la aplicación web EcoTaxa. Esta infraestructura, basada en *machine learning* junto con Redes Neuronales Convolucionales, permite tanto almacenar y clasificar imágenes de una enorme diversidad planctónica como sus metadatos asociados, conformando una base de datos abierta, intuitiva e iterativa. Los usuarios de la aplicación tienen acceso a un árbol taxonómico común y a los procesos completos de identificación taxonómica y almacenamiento de datos, lo que permite que los modelos desarrollados se basen en la totalidad de imágenes almacenadas, procesadas y validadas por numerosos usuarios (Lombard et al., 2019). Este software ha sido utilizado recientemente con el fin de identificar automáticamente muestras de mesozooplankton a partir de un algoritmo supervisado por *machine learning*, aunque las muestras también fueron inspeccionadas visualmente con posterioridad para obtener una clasificación precisa de las diferentes categorías biológicas (Benedetti et al., 2019).

Por otra parte, ImageJ (Wayne Rasband, 1987) es un software estadístico de código abierto para el análisis de imágenes basado en lenguaje de programación Java (Image Processing with ImageJ, segunda edición). En combinación con R y otros paquetes de plug-ins, es empleado en diferentes ramas de la ciencia. Su uso se extiende desde la medicina, la física o la ingeniería hasta la astronomía, habiendo sido utilizado por la NASA para analizar imágenes tomadas por satélite (Image Processing with ImageJ, segunda edición).

ImageJ ha sido utilizado en otros estudios para realizar medidas morfométricas representativas de organismos zooplanctónicos (Ohman & Romagnan, 2016; Greer et al., 2017). Así mismo, algunos plug-ins derivados de ImageJ, como es el caso de ZooImage, son utilizados principalmente en la identificación taxonómica de muestras de plancton (Grosjean, Denis & Wacquet, 2018, Manual de usuario de ZooImage).

Finalidad y objetivo del presente trabajo

La finalidad de este trabajo es encontrar una metodología alternativa a la usada actualmente que, permitiendo estimar la biomasa individual de organismos planctónicos, conlleve una reducción de los tiempos de análisis y evite la destrucción de las muestras analizadas.

Para ello, se plantea con objetivo principal de este estudio el formular una serie de relaciones estadísticas que correlacionen las distintas áreas de un set de organismos frecuentemente encontrados en el zooplancton marino con su biomasa. Siendo así, estas relaciones permitirán posteriormente convertir de forma automatizada las áreas de los organismos obtenidas mediante equipos de captura de imágenes (cámaras fotográficas, escáneres, etc) en estimas de biomasa.

2. MATERIAL Y MÉTODO

La metodología aplicada a cada uno de los taxones de zooplancton consistió en un proceso sucesivo y continuo de análisis de imagen y análisis gravimétricos. A partir de ambos procedimientos se obtuvieron los datos necesarios para construir los modelos que relacionan la talla y la biomasa de los organismos (Fig. 1).

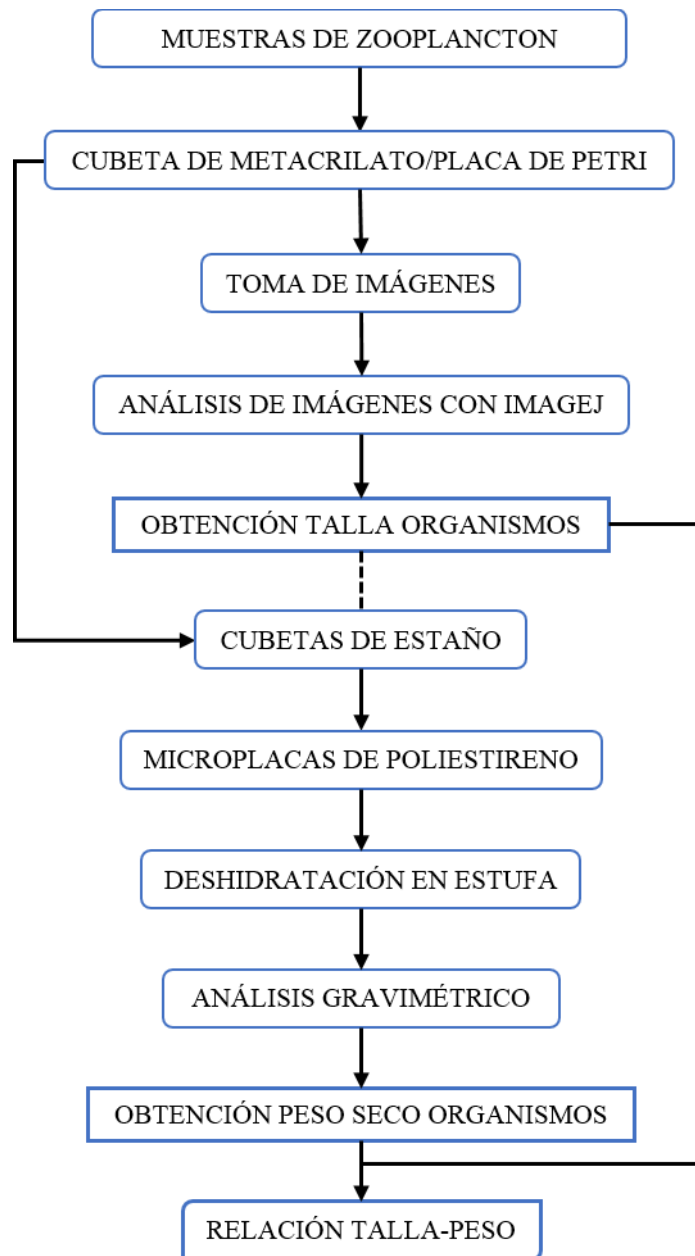


Figura 1. Diagrama de flujo esquemático del proceso metodológico seguido para la obtención de las relaciones talla-peso de los organismos zooplanctónicos analizados.

2.1 Obtención y pretratamiento de las muestras

Los organismos zooplanctónicos analizados en este trabajo fueron obtenidos durante la Expedición de circunnavegación Malaspina 2010, a bordo del Buque Oceanográfico Hespérides, de la cual fue partícipe la Universidad de Cádiz. El propio diseño de la Expedición ha permitido obtener muestras de una gran variedad de regiones biogeográficas, por lo que para un mismo taxón se han podido cuantificar las posibles variaciones de biomasa.

Tras identificar y clasificar las muestras, los organismos fueron introducidos y almacenados en tubos de plástico inerte según su categoría taxonómica y estación de muestreo de procedencia. Con el fin asegurar su correcta conservación, los tubos contenían una disolución de formol al 4% junto con rosa de Bengala. Esta tinción facilita la visualización de los individuos más pequeños o de aquellos que presentan estructuras gelatinosas y traslúcidas.

Se analizaron un total de 2995 ejemplares procedentes de las estaciones de muestreo 39, 49, 51, 55, 77, 78 y 82, repartidas por el Océano Atlántico Sur, Océano Índico Sur y Océano Pacífico (Fig. 2). Se seleccionaron 31 taxones de meso-zooplankton diferentes: Atlantidae, Calanoidae, Calocalanoidae, Clytemnestridae, *Corycaeus*, *Creseis*, *Cypris*, Dolilidos, Dyphiidae, Euphausiacea, *Halobates*, Hyperiididae, *Idotea*, Limacinidae, *Lucicutia*, *Luciferidae*, *Macrosetella*, *Mecynocera*, Megalopas, Mysidacea, *Oithona*, Ostracoda, *Pleuromamma*, Pontellidae, *Pontellina plumata*, Quetognathos, Salpa, *Sapphirina*, Sergestidae protozoa, *Synopia* y *Velella*.

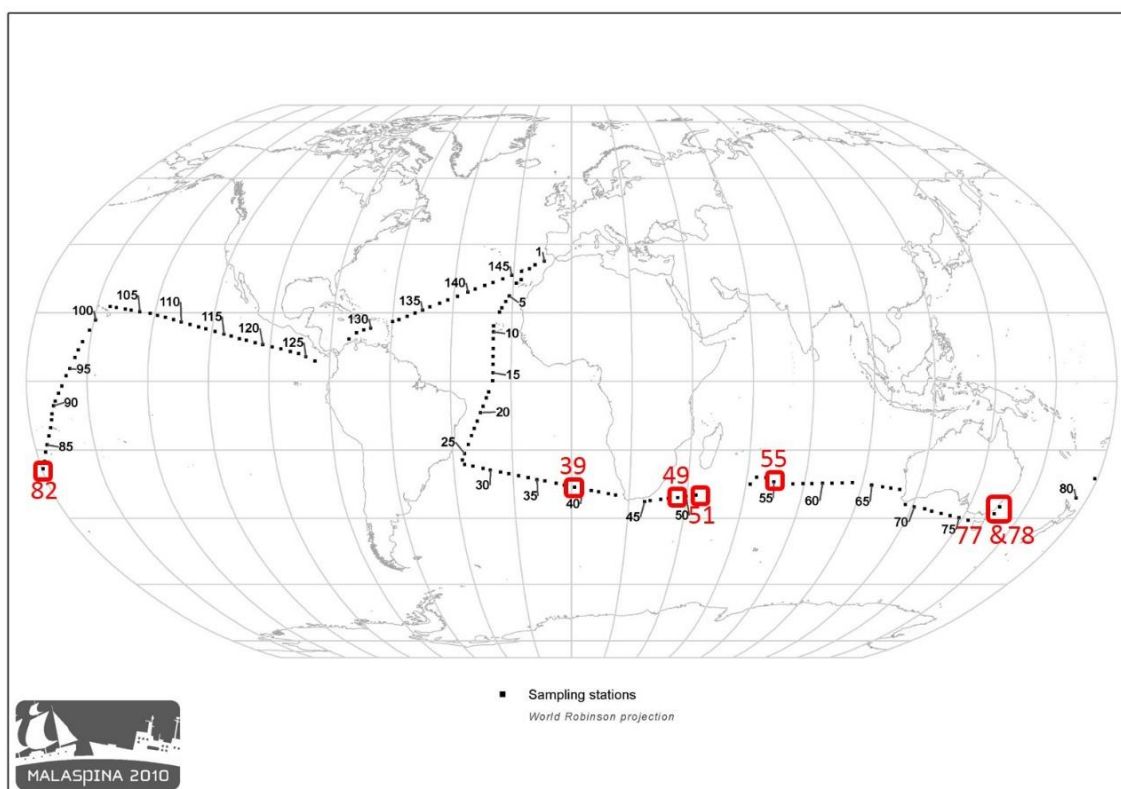


Figura 2. Ruta efectuada por la expedición oceanográfica Malaspina 2010 y localización de las estaciones (marcadas en rojo) de las cuales provienen las muestras de zooplancton analizadas.

2.2 Análisis de las muestras de zooplancton

2.2.1 Preparación de las muestras y toma de imágenes

Una vez seleccionadas las muestras a analizar, se procedió fotografiar los especímenes taxón a taxón. Los individuos se colocaron en una cubeta de metacrilato transparente con una fina película de formol para procurar que los organismos quedaran estáticos, pero sin extraerlo por completo para impedir la desecación de las muestras. De ser necesario, los organismos se separaron entre sí manualmente por la superficie del recipiente para evitar el solapamiento de los mismos (Fig. 3).

Cuando el volumen de muestra o los organismos eran de tamaño muy reducido (sobre todo en el caso de copépodos) se utilizó como recipiente una placa Petri de vidrio de en lugar de la cubeta (Fig. 4).



Figura 3. Ejemplo de fotografía para análisis de tamaño del taxón Atlantidae, utilizando una cubeta de metacrilato colocada sobre la plataforma retroiluminada.

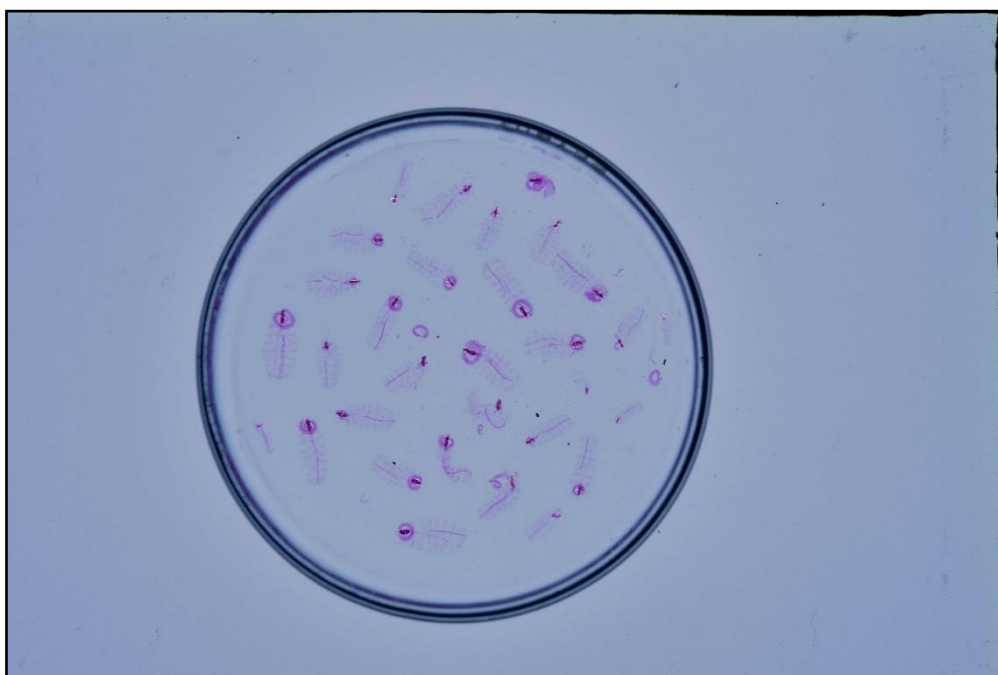


Figura 4. Ejemplo de fotografía para análisis de tamaño del taxón Salpa, utilizando una placa de Petri colocada sobre la plataforma retroiluminada.

Los recipientes se colocaron sobre un estativo de fotografía retroiluminado. La luz proyectada por la plataforma desde abajo de los recipientes transparentes facilita la visualización de las muestras, teñidas de rosa de Bengala, así como la toma de imágenes macro con la cámara fotográfica.

Se utilizó una cámara Nikon D810 con un objetivo AF-S Micro NIKKOR de 60 mm para la toma de imágenes. La cámara fue anclada y orientada hacia abajo en un soporte vertical unido a la plataforma, a una distancia fija de 12,7 cm (5") de la misma (Fig. 5). Se designó un área sobre la superficie del estativo, igual a la superficie de los recipientes de metacrilato, donde se ubicarían las muestras para efectuar las fotografías. Se tomaron medidas de la escala de dicha área, necesarias para introducirlas en el software de análisis de imagen (Fig. 7) con la finalidad de que la toma de imágenes fuera equitativa para todas las muestras (Fig. 6).

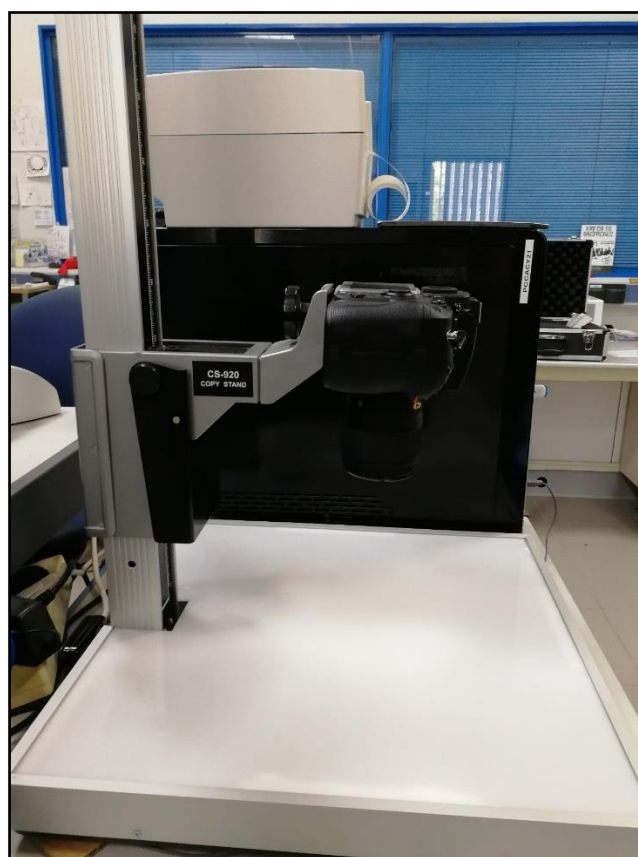


Figura 5. Área de trabajo con la cámara fotográfica anclada y enfocada hacia la plataforma retroiluminada donde se colocan los recipientes con las muestras.

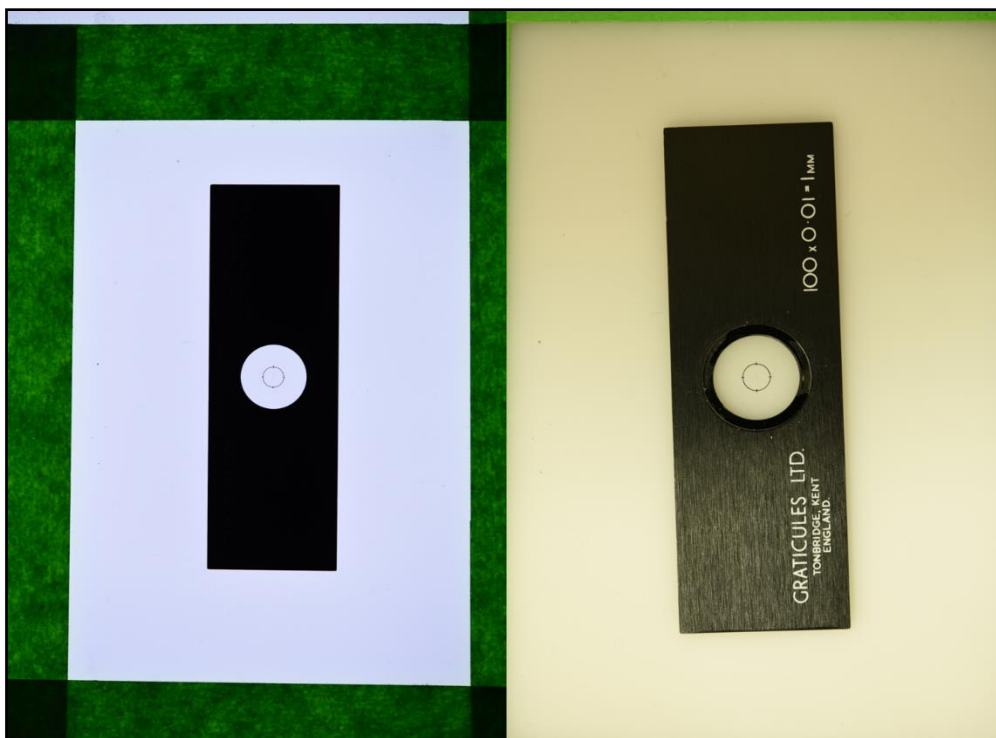


Figura 6. Ubicación marcada y delimitada (izq.) y escala del área de trabajo (der.) sobre el estativo retroiluminado en el que se ubicaron los recipientes para la toma de imágenes.

La cámara fotográfica se conectó directamente a un ordenador situado al lado de la plataforma. Se utilizó el software NControlPro para controlar los parámetros de la cámara, observar en la pantalla del ordenador la imagen en vivo que se obtendría y disparar sin la necesidad de contacto directo con el aparato. De esta manera se aseguran la estabilidad, la nitidez de las imágenes captadas y se agiliza el proceso de toma de fotografías. Los parámetros de la cámara fueron establecidos con la finalidad de obtener imágenes con la mayor resolución posible, teniendo en cuenta el pequeño tamaño de los organismos zooplanctónicos y las características del equipo utilizado. Las fotografías se tomaron con una velocidad de obturador de entre 1/200 y 1/150 y una apertura de diafragma de f/11. Las imágenes obtenidas se compilaron en formato RAW+JPEG.

2.2.2 Análisis de imagen.

La medición de la talla (área) de los organismos se llevó a cabo inmediatamente después de tomar cada fotografía, mediante el software ImageJ. Este programa representa una buena solución operacional para el análisis de imagen y la medición morfométrica de organismos zooplanctónicos (Ohman & Romagnan 2016; Greer et al. 2017). Durante el procesamiento de cada imagen, el recipiente situado encima de la plataforma no se manipuló, de manera que los especímenes permanecieran en sus posiciones iniciales dentro del mismo.

Al cargar las imágenes en ImageJ, se calibró el programa para darle a conocer las dimensiones de los píxeles y la unidad de medida. Estos parámetros son imprescindibles para permitir a ImageJ escalar y analizar cada fotografía. Los valores de los parámetros (Fig. 7) fueron iguales para todas las muestras fotografiadas ya que se correspondían con la resolución de las imágenes y la distancia relativa entre la cámara y las muestras, factores que se mantuvieron constantes a lo largo de todo el procedimiento.

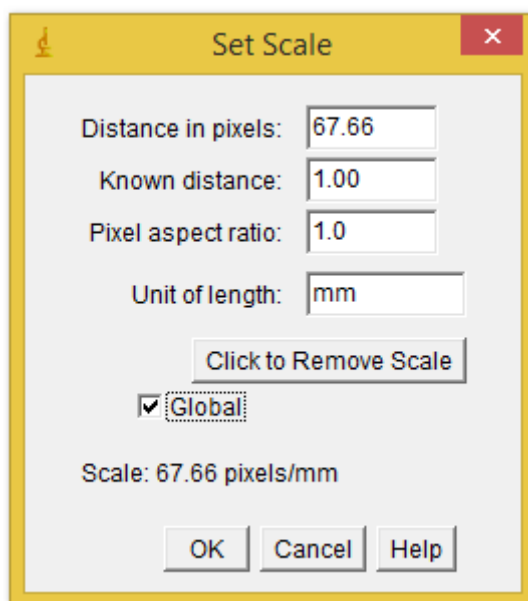


Figura 7. Parámetros de escala y sus correspondientes valores introducidos en ImageJ. La casilla marcada “Global” aplica estos parámetros a todas las imágenes cargadas en el programa.

Se hizo uso de la herramienta “varita” (Wand tracing tool) para seleccionar manualmente los organismos zooplanctónicos dentro de la imagen. Esta herramienta permite hacer una selección poligonal y opera de forma similar a las varitas de otros programas como Photoshop o Gimp (Image Processing with ImageJ, Second Edition). Al hacer click sobre un pixel perteneciente a un organismo, el software selecciona los píxeles con una intensidad o color similares (en función de la tolerancia), creando un área irregular alrededor de ellos y discriminándolos del resto de la imagen. Se utilizó una tolerancia de entre 30 y 60 dependiendo del grado de tinción de los especímenes. En los casos en los que los organismos estuvieran poco teñidos o tuviesen una morfología gelatinosa o translúcida (como en el caso de Salpas y Doliolidos) se modificó el brillo y el contraste de las imágenes, intensificándolas para facilitar el uso de esta herramienta.

Una vez seleccionada el área determinada para un organismo, se obtuvo su medida en milímetros cuadrados utilizando la herramienta “Measure”. Los valores se recopilaron en una tabla generada por ImageJ que se exportó posteriormente a una base datos Excel.

El hecho de poder identificar un organismo zooplanctónico concreto tanto en la imagen procesada como en la cubeta es imprescindible para poder transportarlo posteriormente a un pocillo de estaño y proceder con el análisis gravimétrico.

2.2.3 Análisis gravimétrico. Estima de la biomasa mediante peso seco.

El contenido orgánico de los ejemplares fue estimado a partir de peso seco, utilizando el procedimiento estandarizado descrito por Lovegrove (1966).

Inicialmente se pesaron cubetas de estaño vacías de 0,04 mL de capacidad en una balanza de precisión. Los organismos se ordenaron de menor a mayor según su talla en la tabla generada por ImageJ. Se utilizaron unas pinzas de laboratorio de punta recta fina para trasladar los especímenes en dicho orden desde los recipientes hasta las de cubetas de estaño ya pesadas. Las cubetas se introdujeron en microplacas de poliestireno transparente de 96 pocillos coordinados (Fig. 8), apuntando el/los organismo/s que contenía cada cubeta de estaño y la posición de ésta en la placa (Tabla I).

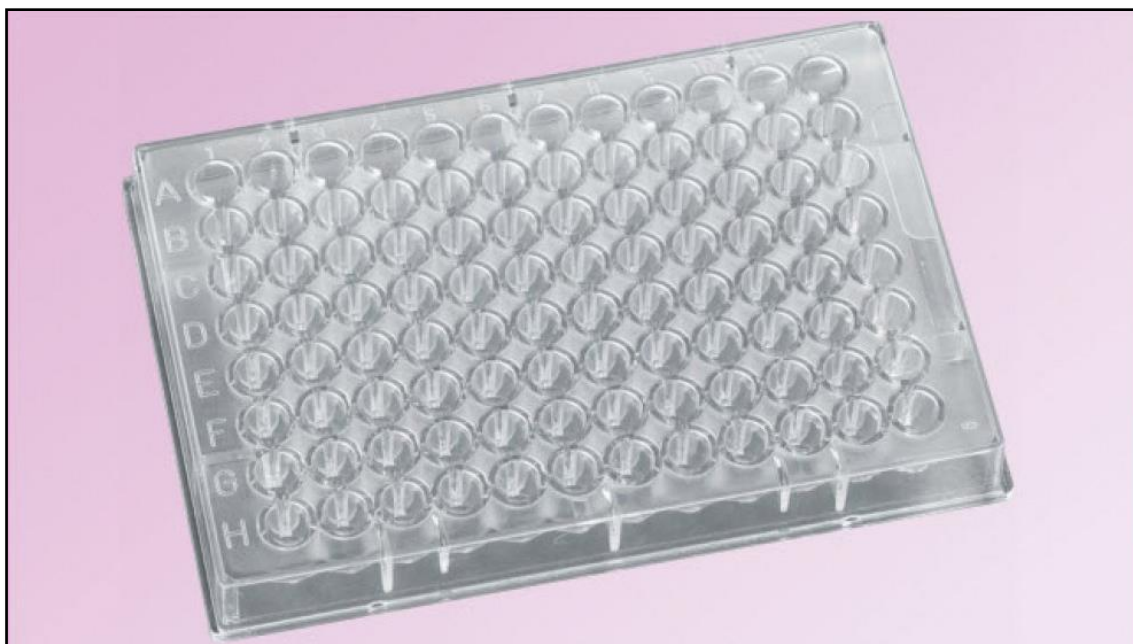


Figura 8. Microplaca de poliestireno de 96 pocillos utilizada para deshidratar las muestras en la estufa. A cada pocillo le corresponde una coordenada formada por una letra y un número. En cada pocillo se introdujo una cubeta de estaño que incluían los organismos de talla conocida.

Tabla I. Ejemplo de una sección de la tabla construida para coordinar tres individuos de Atlantidae en las microplacas. En este caso concreto, el organismo con el número 2 en la imagen, al ser el de menor talla, se introdujo primero en la placa número 14, en el pocillo C11. El procedimiento fue equivalente para todos los especímenes.

Atlantidae (MH048N039S012GTF24)		
Nº en la imagen	Coordenadas placa	Talla (mm ²)
2	14.C11	1.690
3	14.C12	1.903
1	14.C13	2.021

Se comprobó empíricamente que, en la mayoría de los casos, la sensibilidad de la balanza de precisión era insuficiente para pesar organismos $< 1 \text{ mm}^2$. Por ello, para individuos cuya área fuese $< 1 \text{ mm}^2$, se introdujeron varios organismos de talla similar en una misma cubeta de estaño hasta que la suma de sus tallas alcanzase o superase dicha cifra.

Las placas con las cubetas de estaño y los individuos en su interior se introdujeron en una estufa a 60 °C durante 24 horas, eliminando por completo el contenido acuoso de los organismos. Una vez extraídas de la estufa, las placas fueron trasladadas a un desecador con gel de sílice para evitar la reabsorción de humedad. Tras ello, se volvieron a pesar las cubetas de estaño una a una en la balanza de precisión previamente calibrada. Mediante la diferencia de peso entre las cubetas vacías y las cubetas con las muestras en su interior, se obtuvo el peso seco de cada individuo zooplanctónico. Para las cubetas con más de un espécimen, se dividió el peso obtenido entre el número de organismos que contenía la cubeta para hallar el peso medio, que se correspondería con el área media del conjunto de individuos de dicha cubeta.

2.2.4 Análisis estadístico de las muestras. Obtención de las relaciones talla-peso.

La obtención de los factores de conversión para los diferentes taxones se llevó a cabo mediante un ajuste lineal. Este procedimiento ha sido empleado y estandarizado en pasados estudios para establecer relaciones entre talla y peso de organismos zooplanctónicos (Hernández-León & Montero, 2006; Lehetete & Hernández-León, 2009).

La ecuación que describe la línea de mínimos cuadrados en al que se basa el modelo lineal tiene la forma:

$$y = b * x + a$$

Donde ***b*** se corresponde con la pendiente de la recta y ***a*** con la coordenada de intersección en ***y***. Las incógnitas ***y*** junto con ***x*** son las variables explicada y explicativa, respectivamente.

La calidad y potencia del ajuste con respecto a los datos analizados viene dado por el coeficiente de determinación (R^2). En el caso de regresiones lineales simples, este coeficiente se entiende como el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson, el cual indica el grado de relación entre dos variables cuantitativas y continuas. R^2 comprende un rango de valores de 0 a 1, siendo 1 el valor que indica una relación directa y proporcional entre las variables analizadas.

Así mismo, se ha tenido en cuenta el P valor (p-value) obtenido para cada regresión lineal. Un p-value bajo, usualmente <0.05 , permite rechazar la hipótesis nula y por tanto establece una adición significativa a su modelo, es decir, los cambios en la variable explicada (en este caso el peso) estarán relacionados con los cambios en la variable explicativa (en este caso el área). Aun obteniendo un R^2 pequeño, un p-value significativo hace posible validar la relación entre ambas variables.

Para eliminar los posibles valores atípicos de la base de datos, se aplicó un análisis mediante diagramas de cajas. Este método estandarizado grafica los datos numéricos de una variable en función de sus cuartiles, permitiendo visualizar fácilmente su mediana y los valores atípicos que contengan.

Los valores de talla y peso seco registrados se recopilaron en una base de datos en Excel. El software estadístico R, en conjunción con la interfaz gráfica R-commander (Rcmdr), fue el elegido para llevar a cabo las regresiones lineales. También se utilizó este programa para graficar los modelos lineales y los diagramas de cajas desarrollados para depurar los datos y eliminar valores anómalos. Para la representación gráfica y el cálculo de las ecuaciones, se dispusieron en el eje de abscisas el peso como variable explicada y en el eje de ordenadas la talla como variable explicativa.

Teóricamente, las ecuaciones obtenidas con un R^2 próximo a 1 podrían considerarse representativas (siempre y cuando el p-value sea significativo) y capaces de estimar la cantidad de materia orgánica de individuos zooplanctónicos que se encontrasen dentro del rango de tamaños analizado, introduciendo el valor del área correspondiente en la variable x y obteniendo su biomasa como peso seco en la variable y .

3. RESULTADOS

El número total de organismos zooplanctónicos a partir de los cuales se han extraído los resultados ha sido de 1246 individuos, agrupados en 31 taxones y pertenecientes a 7 localidades de muestreos que se corresponden con 4 áreas biogeográficas (Tabla II).

Tabla II. Caracterización de los datos según el volumen de muestra, localidad y provincia de procedencia.

Taxón	Nº indiv.	Localidad	Provincia Biogeográfica
Atlantidae	15	Stat 39	Sur Atlántico
Atlantidae	4	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Atlantidae	2	Stat 77	Mar de Tasmania
Calanoidae	16	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Calanoidae	1	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
Calanoidae	28	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Calanoidae	57	Stat 77	Mar de Tasmania
Calanoidae	20	Stat 78	Mar de Tasmania
Calocalanoidae	2	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Calocalanoidae	3	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Clytemnestridae	13	Stat 77	Mar de Tasmania
Clytemnestridae	15	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Corycaeus</i>	5	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Corycaeus</i>	9	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Corycaeus</i>	7	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Corycaeus</i>	8	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Creseis</i>	1	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Cypris</i>	6	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Cypris</i>	23	Stat 77	Mar de Tasmania
Doliolidos	2	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Doliolidos	19	Stat 77	Mar de Tasmania
Dyphiidae	2	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
Dyphiidae	16	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Dyphiidae	17	Stat 77	Mar de Tasmania
Dyphiidae	15	Stat 78	Mar de Tasmania
Euphausiacea	12	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Euphausiacea	4	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Euphausiacea	16	Stat 77	Mar de Tasmania
Euphausiacea	13	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Halobates</i>	4	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Halobates</i>	2	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Halobates</i>	17	Stat 82	Giro subtropical del Pacífico Sur

Tabla II. (Continuación)

Taxón	Nº indiv.	Localidad	Provincia Biogeográfica
Hyperiididae	44	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Hyperiididae	33	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Idotea</i>	46	Stat 77	Mar de Tasmania
Limacinidae	4	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Limacinidae	4	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Limacinidae	12	Stat 77	Mar de Tasmania
Limacinidae	2	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Lucicutia</i>	7	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Luciferidae</i>	1	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Luciferidae</i>	2	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Luciferidae</i>	4	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Macrosetella</i>	10	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Macrosetella</i>	4	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Mecynocera</i>	3	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Mecynocera</i>	4	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Mecynocera</i>	5	Stat 78	Mar de Tasmania
Megalopas	30	Stat 77	Mar de Tasmania
Mysidacea	20	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Mysidacea	27	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Mysidacea	37	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Oithona</i>	3	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Oithona</i>	3	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Oithona</i>	4	Stat 82	Giro subtropical del Pacífico Sur
Ostracoda	11	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Ostracoda	4	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Ostracoda	8	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Peluromamma</i>	12	Stat 77	Mar de Tasmania
Pontellidae	3	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
Pontellidae	28	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Pontellidae	54	Stat 77	Mar de Tasmania
Pontellidae	19	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Pontellina plumata</i>	10	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Pontellina plumata</i>	17	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Pontellina plumata</i>	2	Stat 78	Mar de Tasmania
Quetognathos	2	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Quetognathos	23	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
Quetognathos	19	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
Quetognathos	27	Stat 77	Mar de Tasmania
Quetognathos	19	Stat 78	Mar de Tasmania
Salpas	9	Stat 49	Giro subtropical del Índico Sur
Salpas	18	Stat 51	Giro subtropical del Índico Sur
Salpas	152	Stat 77	Mar de Tasmania
Salpas	21	Stat 78	Mar de Tasmania

Tabla II. (Continuación)

Taxón	Nº indiv.	Localidad	Provincia Biogeográfica
<i>Sapphirina</i>	9	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Sapphirina</i>	22	Stat 77	Mar de Tasmania
Sergetidae protozoa	23	Stat 39	Sur Atlántico
Sergetidae protozoa	5	Stat 78	Mar de Tasmania
<i>Synopia</i>	13	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Synopia</i>	5	Stat 77	Mar de Tasmania
<i>Velella</i>	20	Stat 55	Giro subtropical del Índico Sur
<i>Velella</i>	8	Stat 77	Mar de Tasmania

Relaciones talla-peso

Las ecuaciones lineales que se han descrito presentan diversos grados de ajuste en función de los taxones de zooplancton analizados. Se ha observado que la calidad del ajuste, según el coeficiente de determinación (R^2), disminuye considerablemente en algunos taxones. Sin embargo, solo 9 de los 31 taxones presentan un p-value no significativo, por lo tanto, en la mayoría de los casos es posible validar una relación entre las variables talla y biomasa.

Para la interpretación y discusión de los resultados, a partir de datos representativos, se debe reflejar la importancia de las pendientes de los modelos. Este valor relaciona directamente las variables talla y peso de modo que, según la pendiente, se podrá inferir que un organismo de talla conocida tendrá un peso proporcionalmente mayor o menor, en función de la ecuación descrita. Cuanto mayor sea la pendiente, más elevado será el incremento de peso de esa especie respecto a su crecimiento en tamaño. Esto puede proporcionar una idea de las tasas de crecimiento de la especie en cuestión, permitiendo realizar comparaciones con datos de otras regiones biogeográficas.

Los valores comprendidos por la variable talla, determinados mediante análisis de imagen, varía ampliamente dependiendo del taxón. A fin de obtener una visualización directa que proporcione una idea de dichos espectros, comparar los resultados obtenidos entre los diferentes taxones y cotejarlos con otros estudios, se ha construido una representación esquemática del rango de valores de la talla de los organismos zooplanctónicos estudiados según su taxón (Fig. 9).

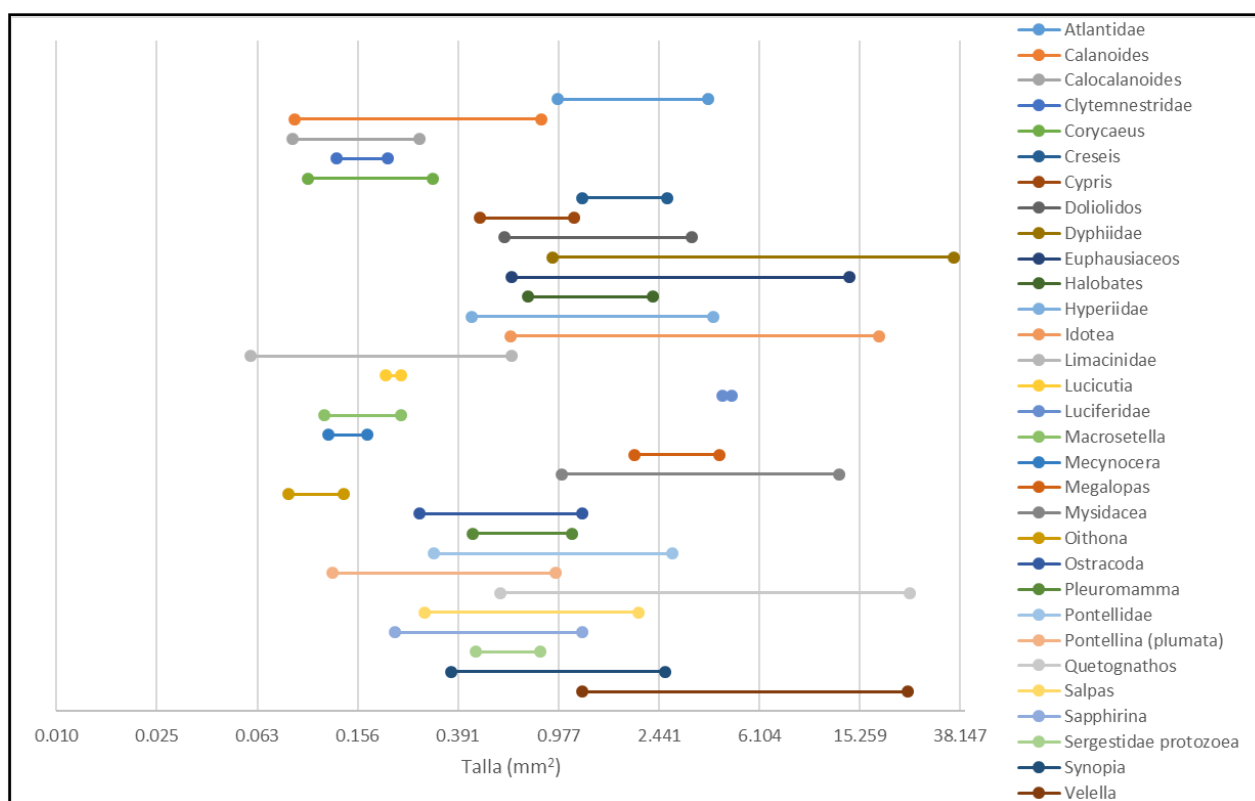


Figura 9. Rango de talla abarcado por los diferentes taxones de zooplancton analizados.

Para facilitar la interpretación de los resultados en base a la calidad y la potencia de los ajustes, se han recogido los valores de regresión para los 31 taxones de zooplancton en la Tabla III. A partir de ello, y debido al elevado número de taxones analizados, se han creado cuatro categorías diferentes para agruparlos en función de sus Coeficientes de determinación y p-values, lo que indica cuán adecuada y significativa ha resultado la aplicación de la regresión lineal a la hora de obtener una relación entre talla y peso:

- A. Taxones cuyos valores de regresión sean $R^2 > 0.6$ y p-value < 0.05 (en muchos casos < 0.001). Incluye los taxones que presentan una alta correlación y significación estadística con respecto al modelo.
- B. Taxones cuyos valores de regresión sean $R^2 < 0.6$ y p-value < 0.05 . Aquellos cuyo modelo lineal no se ajusta a los datos, pero cuyo p-value permite validar la relación entre las variables talla y peso.
- C. Taxones cuyos valores de regresión sean $R^2 < 0.6$ y p-value > 0.05 . Agrupa los taxones en los que regresión lineal no se ajusta los resultados.
- D. Taxones cuyos valores de regresión sean $R^2 < 0.1$ y p-value $>> 0.1$. Casos extremos de la categoría C.

Tabla III. Parámetros de las regresiones lineales y correlaciones para cada taxón. Siendo *a* la Intercepción, *b* la Pendiente de la recta del ajuste lineal, R^2 el Coeficiente de Determinación, *P* la Significación del modelo o p-value, *n* el número de organismos analizados, *Talla* el rango de área corporal comprendido por los organismos del taxón correspondiente y *Cat.* la categoría en la que se ha incluido cada taxón según los parámetros descritos anteriormente.

Taxón	a	b	R²	P	n	Talla (mm²)	Cat.
Atlantidae	-25.078	62.848	0.946	<0.001	21	0.966-3.826	A
Calanoides	-0.981	34.761	0.600	<0.001	122	0.088-0.834	A
Calocalanoides	1.393	8.307	0.152	0.516	5	0.086-0.274	C
Clytemnestridae	4173.000	-0.047	<0.1	0.9981	28	0.129-0.205	D
<i>Corycaeus</i>	0.835	31.359	0.847	<0.05	29	0.099-0.310	A
<i>Creseis</i>	31.700	45.520	0.257	<0.05	24	1.215-2.627	B
<i>Cypris</i>	13.512	93.046	0.877	<0.05	6	0.478-1.121	A
Doliolidos	7.791	7.093	0.199	0.056	21	0.598-3.303	B
Dyphiidae	-32.202	17.180	0.716	<0.001	50	0.922-36.033	A
Euphausiacea	-359.320	215.310	0.888	<0.001	45	0.638-13.816	A
<i>Halobates</i>	-9.729	70.224	0.339	<0.05	23	0.739-2.302	B
Hyperiididae	8.987	39.891	0.716	<0.001	77	0.442-4.013	A
<i>Idotea</i>	-258.910	214.470	0.774	<0.001	46	0.632-18.168	A
Limacinidae	-0.954	51.719	0.938	<0.001	22	0.059-0.639	A
<i>Lucicutia</i>	4.476	12.730	0.109	0.5229	7	0.201-0.352	C
<i>Luciferidae</i>	48.157	9.668	0.237	0.3276	7	4.359-4.755	C
<i>Macrosetella</i>	1.183	28.988	0.141	0.186	14	0.115-0.231	C
<i>Mecynocera</i>	0.667	51.088	0.250	0.1415	12	0.120-0.171	C
Megalopas	116.820	74.630	0.360	<0.001	30	1.960-4.236	B
Mysidacea	-104.423	158.519	0.886	<0.001	84	1.005-12.625	A
<i>Oithona</i>	1.936	7.476	<0.1	0.8092	10	0.083-0.138	D
Ostracoda	3.306	34.081	0.625	<0.001	23	0.274-1.207	A
<i>Pleuromamma</i>	26.630	20.570	0.074	0.392	12	0.448-1.101	C
Pontellidae	-33.700	120.330	0.629	<0.001	104	0.314-2.768	A
<i>Pontellina plumata</i>	-6.602	69.209	0.938	<0.001	29	0.124-0.950	A
Quetognathos	29.253	13.760	0.783	<0.001	90	0.573-23.962	A
Salpas	101.164	44.297	0.143	<0.001	200	0.287-2.033	B
<i>Sapphirina</i>	2.581	16.707	0.341	<0.001	31	0.219-1.212	B
Sergetidae protozoa	3.017	23.361	0.504	<0.001	28	0.459-0.827	B
<i>Synopia</i>	8.510	37.010	0.375	<0.05	18	0.368-2.594	B
<i>Velella</i>	54.255	24.591	0.869	<0.001	28	1.216-23.716	A

Del total de taxones presentados y analizados en este trabajo, se han obtenido resultados de buena calidad para 15 de ellos (A), un bajo grado de correlación pero alta significación para 8 (B) y resultados poco representativos para 8 especies más (C y D). Todo ellos se han agrupado en sus categorías correspondientes en base a las pautas descritas en el apartado anterior.

Categoría A

Los taxones para los que el modelo de regresión se ha ajustado mejor a los datos analíticos incluyen: Atlantidae, Calanoides, *Corycaeus*, *Cypris*, Dyphiidae, Euphausiacea, Hyperiididae, *Idotea*, Limacinidae, Mysidacea, Ostracoda, Pontellidae, *Pontellina plumata*, Quetognathos y *Velella*.

Los taxones con mayores áreas corporales con respecto al conjunto de organismos estudiados en el presente trabajo son Dyphiidae, *Idotea*, Mysidacea, Quetognathos y *Velella*, incluidos todos ellos en la Categoría A. A partir del análisis gravimétrico también se ha comprobado que se corresponden con los mayores valores de biomasa medidos, como era de esperar. De igual manera, los taxones con mayores volúmenes de muestra analizados en este estudio también han coincidido en este grupo, con las excepciones de *Cypris* (con solo 6 individuos) y Salpas (el taxón con más individuos analizados incluido en la categoría B).

Dos de los ajustes de mayor potencia obtenidos pertenecen a dos taxones de moluscos gasterópodos (Atlantidae y Limacinidae). Así mismo, presentan pendientes similares (Fig. 10), aunque la mayoría de las muestras pertenecientes a Atlantidae provienen de la estación 39 (situada en el Océano Atlántico Sur) mientras que no se poseen datos de Limacinidae de dicha región atlántica. Este hecho refleja la capacidad de la metodología aplicada para comparar el índice talla-biomasa de poblaciones de organismos de especies cercanas que habitan en áreas geográficas y biotopos distintos.

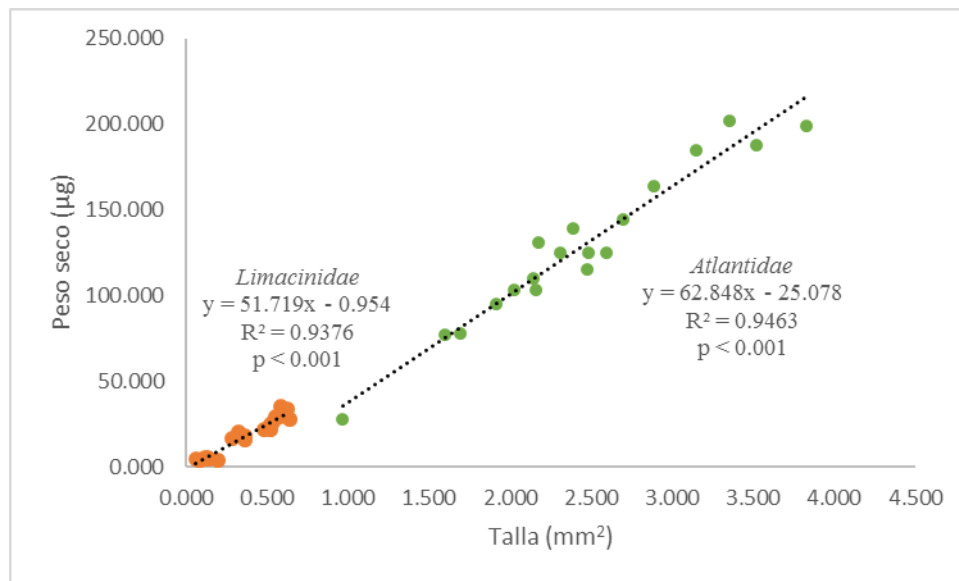


Figura 10. Comparación de los modelos lineales y las rectas de mínimos cuadrados, con sus respectivas ecuaciones y valores de regresión, para los taxones *Limacinidae* (naranja) y *Atlantidae* (verde).

De los diferentes taxones de copépodos estudiados, *Calanoides* y *Corycaeus* presentan pendientes muy similares, proviniendo gran parte de las muestras de ambas especies de las estaciones 55, 77 y 78, localizadas geográficamente en el Océano Índico Sur y costa Este de Australia. En relación a esto, ni *Pontellidae* ni *Pontellina plumata* presentan pendientes similares, debido en parte a que los individuos de estos taxones de copépodos duplican e incluso triplican en tamaño a las nombradas anteriormente (Fig. 11).

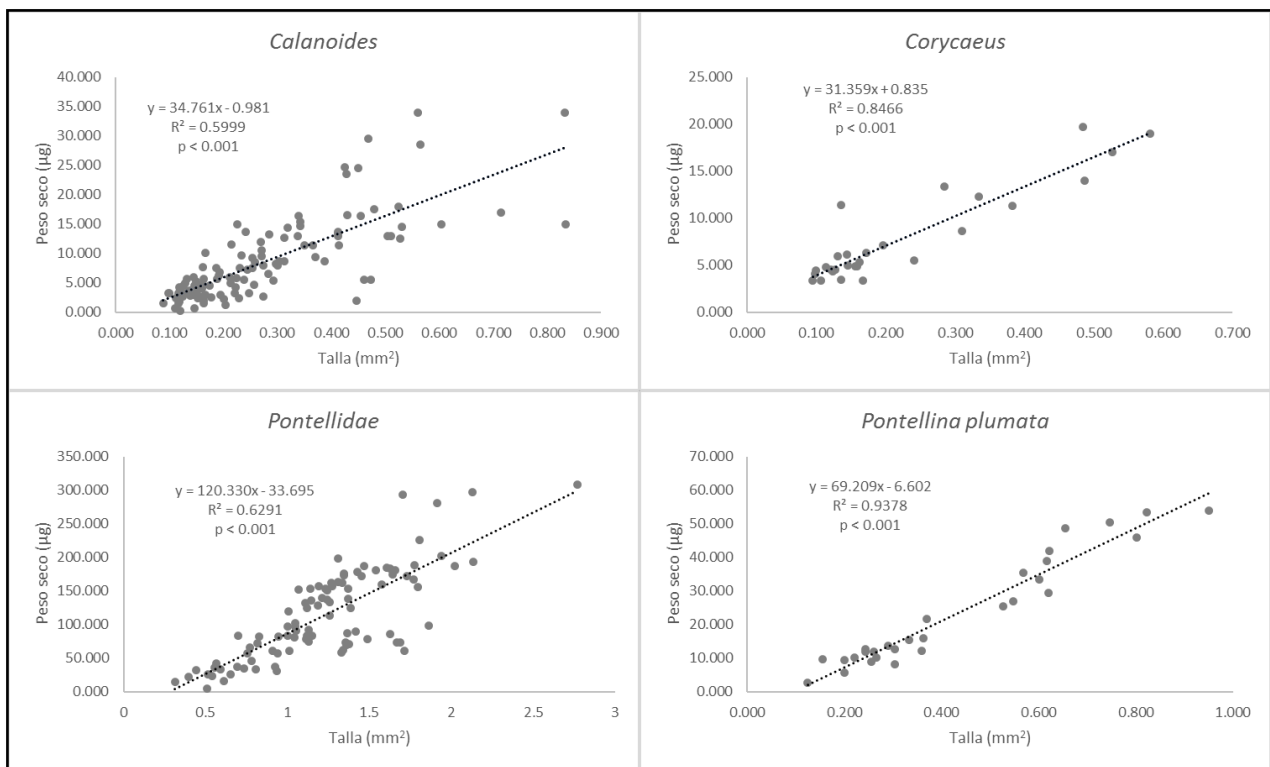


Figura 11. Comparación de los modelos lineales y las rectas de mínimos cuadrados, con sus respectivas ecuaciones y valores de regresión, de los diferentes taxones de copépodos incluidos en la categoría A.

Categoría B

Los taxones con un Coeficiente de determinación alejado de la idealidad, pero con un p-value que permite validar el modelo incluyen: *Creseis*, Doliolidos, *Halobates*, Megalopas, Salpas, *Sapphirina*, Sergestidae protozoa y *Synopia*.

Se puede observar que todos los taxones agrupados bajo la Categoría B incluyen un volumen muestral inferior a 30 individuos. La excepción conformada por el taxón Salpas (con el mayor volumen muestral de todos los taxones analizados en el presente trabajo). En relación a esto, el otro taxón perteneciente a la clase thaliacea y muy emparentados con Salpas es Doliolidos. También han sido incluidos en esta categoría, aunque su p-value (0.056) los sitúa en el límite para poder ser considerados como resultados representativos. Ambas especies presentan las correlaciones más bajas de este grupo.

Categorías C y D

Los taxones cuyos resultados no se han ajustado a los modelos descritos comprenden: Calocalanoides, *Lucicutia*, *Luciferidae*, *Macrosetella*, *Mecynocera* y *Pleuromamma*. Así mismo, las regresiones para Clytemnestridae y Oihtona presentan ajustes realmente pobres, habiendo obtenido una de pendiente negativa para el primero de ellos, con coeficientes de determinación extremadamente altos y bajas significaciones para ambos modelos.

Todos ellos presentan un reducido número de individuos analizado, no alcanzando la docena en la mayoría de los casos. Esto se suma al hecho de que algunas presentan los rangos de tamaño más reducidos de entre la totalidad de taxones analizados en este estudio, como se puede observar en la Figura 9.

A fin de interpretar los resultados en base a otras fuentes, éstos fueron comparados con trabajos anteriores, similares en metodología y objetivos al presente estudio, con especial interés en el cotejado con los trabajos publicados por Hernández-León & Montero en 2006 y Lehet & Hernández-León en 2009. Debido a que dichos trabajos determina la regresión a partir de un modelo potencial en vez de lineal, se han tomado los 4 taxones en común con dicho trabajo (Euphausiacea, Ostracoda, Quetognathos y Salpas) y se les ha aplicado el mismo tratamiento estadístico a partir de los datos depurados mediante diagramas de cajas (Fig. 12).

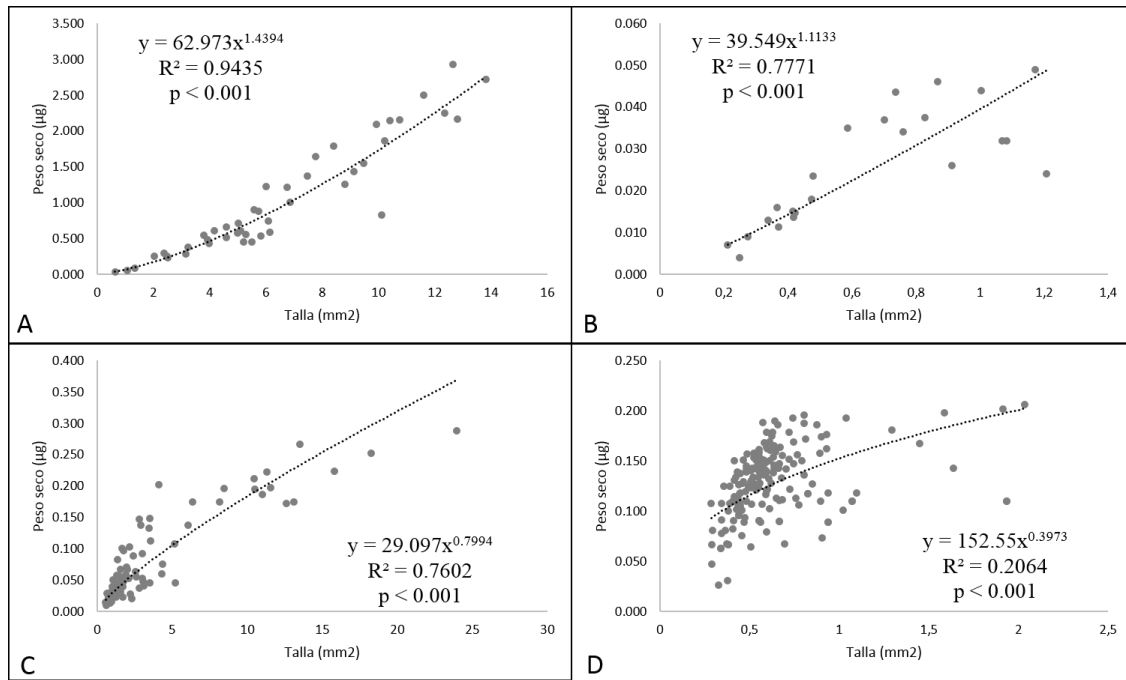


Figura 12. Representación gráfica de los modelos potenciales y sus valores de regresión de los taxones Euphausiacea (A), Ostracoda (B), Quetognathos (C) y Salpas (D).

Para llevar a cabo un análisis en mayor profundidad y poder discutir los resultados en base a su localización geográfica de origen, también se filtraron los datos en función de la estación de muestreo (Tabla IV).

Tabla IV. Parámetros de las regresiones potenciales y correlaciones para cada taxón. Siendo a la Intercepción, b la Pendiente de la curva, R^2 el Coeficiente de Determinación, P la Significación del modelo o p-value, n el número de organismos analizados y *Talla* el rango de área corporal; donde el modelo potencial queda descrito como $y=a*x^{(b)}$.

Taxón	Estación	a	b	R ²	P	n	Talla (mm ²)
Euphausiáceos	49	95.916	1.157	0.6808	< 0.001	12	2.489-6.868
Euphausiáceos	55	172.38	0.671	0.6747	<0.05	4	5.100-10.124
Euphausiáceos	77	53.085	1.565	0.9768	<0.001	16	1.076-13.816
Euphausiáceos	78	68.562	1.415	0.9823	<0.001	13	0.638-12.802
Euphausiáceos totales		62.973	1.439	0.9435	<0.001	45	0.638-13.816
Ostracoda	49	35.135	1.14	0.6957	<0.001	11	0.249-1.207
Ostracoda	55	42.42	1.137	0.6773	<0.05	4	0.274-0.418

Tabla IV. (Continuación)

Taxón	Estación	a	b	R²	P	N	Talla (mm²)
Ostracoda	78	54.314	1.374	0.9574	<0.001	8	0.212-0.867
Ostracoda totales		39.549	1.113	0.7771	<0.001	23	0.212-1.207
Quetognathos	51	32.562	0.877	0.6389	<0.001	22	0.573-5.153
Quetognathos	55	21.024	0.849	0.6958	<0.001	18	0.603-15.816
Quetognathos	77	29.14	0.777	0.9262	<0.001	23	0.667-23.962
Quetognathos	78	31.963	0.832	0.6983	<0.001	18	1.018-11.327
Quetognathos totales		29.097	0.799	0.7602	<0.001	81	0.573-23.962
Salpas	49	31.906	0.397	0.2762	<0.05	7	0.199-0.473
Salpas	51	100.53	0.387	0.7936	<0.001	18	0.263-1.932
Salpas	77	169.26	0.464	0.3241	<0.001	148	0.277-1.638
Salpas	78	146.35	0.963	0.8354	<0.001	18	0.208-2.260
Salpas totales		152.55	0.398	0.2064	<0.001	191	0.208-2.260

En el caso de Euphausiacea se puede observar que las diferencias en la pendiente no son significativas entre las distintas estaciones a excepción de la estación 55. Sin embargo, los organismos obtenidos y muestreados de esta última estación apenas alcanzan la media docena de individuos. Para el conjunto del volumen muestral del taxón, se ha obtenido una alta correlación ($R^2 = 0.9435$) y nivel de significación ($p < 0.001$).

Los valores obtenidos para Ostracoda presentan una correlación menor, pero también se parecía cierta similitud entre las pendientes de los ajustes, especialmente entre las estaciones 49 y 55, ambas situadas en el Océano Índico, siendo la estación 78 la que arroja los mejores resultados en el grado de correlación de las variables.

El análisis de los datos de Quetognathos muestra una alta similitud entre las pendientes de las cuatro estaciones de las que se han obtenido muestras en este estudio, estando localizadas en regiones biogeográficas muy distantes entre sí, en océanos diferentes. Así mismo, se han obtenido correlaciones aceptables, con especial mención de los datos pertenecientes a la estación 77 ($R^2 = 0.9262$).

La talla de Salpas fue obtenida a partir de la medida de su núcleo. Esto es debido a que estos organismos zooplanctónicos poseen un cuerpo frágil y gelatinoso y, a menudo,

la parte más destacada y a partir de la cual se pueden obtener datos más representativos de su morfología es el núcleo (Alcaraz et al., 2003; Lehetete & Hernández-León, 2009). Aun así, Salpas presenta la mayor discrepancia en los valores de las pendientes y en los valores de regresión en general, al igual que ocurre con los modelos lineales. La potencia del ajuste únicamente es remarcable para estación 78, habiéndose obtenido valores de R^2 muy inferiores para las estaciones 49, 51 y 77. Por otra parte, los resultados siguen siendo significativos ya que el p-value respeta el grado de confianza en todos los casos.

En resumen, al igual que en numerosa bibliografía y antecedentes consultados, en general el análisis de los organismos con los rangos de tamaño y peso más amplios han dado como fruto buenas correlaciones entre las variables. Por contraparte, para taxones cuyos organismos poseyeran tallas $<0,5 \text{ mm}^2$ se han obtenido ajustes poco representativos en los que los motivos y consecuencias de esta falta de potencia en los modelos queda abierta para futuros análisis, ya sea debida a errores metodológicos o a la falta de sensibilidad de los sistemas y aparatos utilizados.

4. DISCUSIÓN

Un primer examen de los resultados determina que las relaciones talla-peso, recabadas mediante regresiones lineales a partir de análisis de imagen y metodologías gravimétricas, proporcionan altos grados de correlación y significación para la mayoría de las especies estudiadas. Las ecuaciones con una buena calidad en el ajuste y alta significación podrían ser utilizadas en otros estudios como método no destructivo para la estimación de la biomasa, a la espera de cotejar las semejanzas de los valores de regresión con los de organismos de la misma especie procedentes de distintas regiones biogeográficas.

Las muestras de zooplancton utilizadas para elaborar el presente trabajo provienen de cuatro regiones geográficas bien diferenciadas (Fig. 1 & Tabla II). Factores como la temperatura del agua, la salinidad, la acidez, la presencia de grandes corrientes termohalinas, o la irradiancia afectan a la biodiversidad y a las características fisiológicas de los organismos que habitan dichos hábitats.

La metodología y los resultados descritos no solo proporcionan un procedimiento no destructivo de estimar la biomasa de poblaciones zooplanctónicas, también permiten cotejar los datos de diferentes poblaciones extraídas de áreas biogeográficas diversas e interpretar posteriormente qué factores afectan a sus diferencias o similitudes.

Categoría A

Entre los taxones incluidos en esta categoría se encuentran las dos especies de crustáceos malacostraca Euphausiacea y Mysidacea (Fig 13). Los datos han sido extraídos a partir de muestras provenientes de estaciones comunes para ambos taxones y muy próximas entre sí: 49, 55 al SW del Océano Índico por una parte y 77, 78 al Este de la costa australiana por otra, para los dos casos.

A partir de la comparación con los resultados del trabajo de Hernández-León & Montero (2006), se concluye que estas especies se ajustan mejor a un modelo potencial que a uno lineal (ej. en Euphausiacea $R^2 = 0.8877$ para el modelo lineal y $R^2 = 0.9435$ para el modelo potencial). Por este motivo, también se ha procedido a comparar los ajustes potenciales para ambos taxones (Fig. 14), donde se puede observar que las pendientes de ambos ajustes no presentan diferencias significativas.

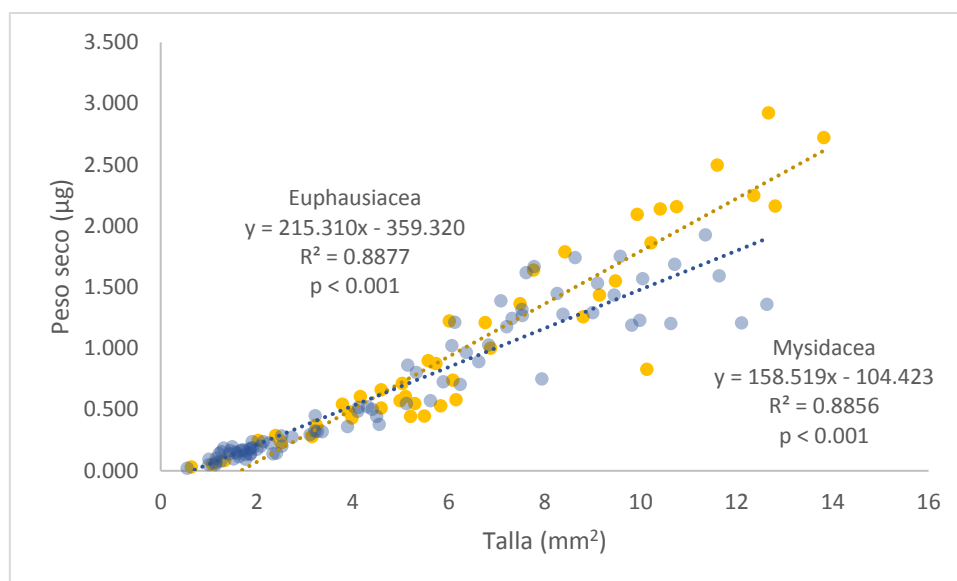


Figura 13. Comparación de los modelos lineales y las rectas de mínimos cuadrados, con sus respectivas ecuaciones y valores de regresión, para los taxones Euphausiacea (amarillo) y Mysidacea (azul).

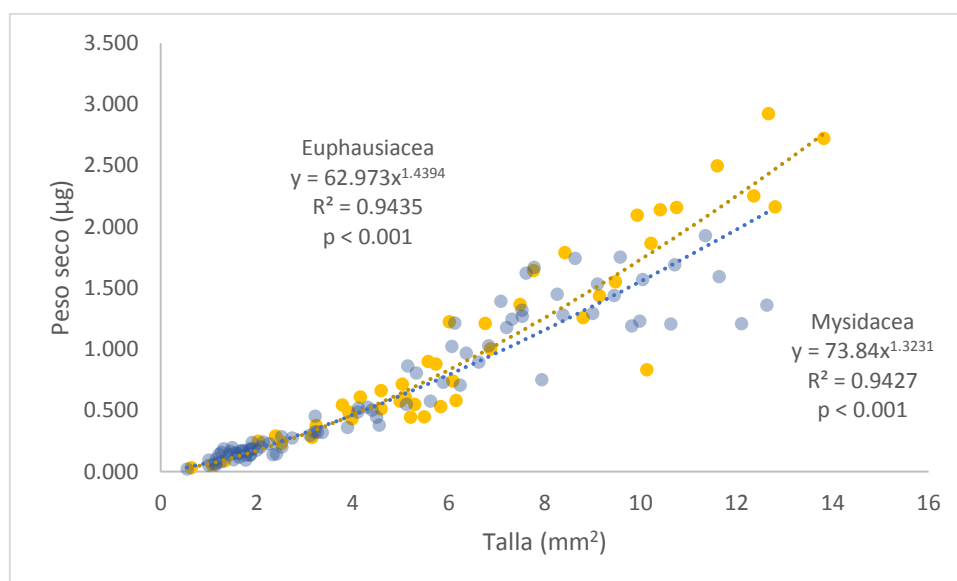


Figura 14. Comparación de los modelos potenciales, con sus respectivas ecuaciones y valores de regresión, para los taxones Euphausiacea (amarillo) y Mysidacea (azul).

Esto representa un caso similar al de Atlantidae y Limacinidae descrito anteriormente, estableciendo no solo una relación entre talla y peso para cada una de las especies de crustáceos si no también una metodología capaz de proporcionar datos

representativos a través de los cuales comparar poblaciones de la misma especie o de especies con un alto grado de parentesco.

Con respecto a los taxones para los que se ha aplicado el modelo potencial (Tabla IV), para contrastarlos con los determinados por Lehette & Hernández-León en 2009 (cuyos datos proceden de las Islas Canarias y la Península Antártica), Euphausiacea ($b=1.439$) presenta una pendiente muy similar a la determinada por dicho trabajo ($b=1.34\pm0.04$). Los valores obtenidos para el taxón Ostracoda ($b=1.113$) también coinciden con el mencionado estudio ($b=1.28\pm0.19$). Por el contrario, tanto para Quetognathos como para Salpas no se observan semejanzas con los valores aportados, siendo este último taxón el que presenta mayor grado de disparidad.

En general, la totalidad de taxones recogidos bajo esta categoría destacan la capacidad de la metodología utilizada para medir la talla a partir de la superficie corporal de los organismos, la biomasa a partir del peso seco, así como de establecer relaciones consistentes y representativas que permitan inferir la biomasa a partir del análisis de imágenes.

Categoría B

Las bajas correlaciones obtenidas para los taxones Salpas y Doliolidos puede ser debido a que, la morfología gelatinosa de estos organismos y el contenido altamente inconsistente de materia orgánica en sus tejidos, compuestos por un elevado porcentaje de agua, dificulta a los softwares de análisis de imagen discernir correctamente los límites de los individuos (Lehette & Hernández-León, 2009). Así mismo, tras ser introducidos en la estufa, la cantidad de materia orgánica deshidratada resultante de estos organismos es muy pequeña. Aun así, las estimaciones de biomasa a partir de peso húmedo y las relaciones para estimar peso seco a partir de peso húmedo deben evitarse para este tipo de organismos gelatinosos debido a que el alto contenido acuoso de los individuos introduce grandes fuentes de error en las medidas (Le Borgne, 1975; Wiebe, 1988; Postel et al., 2000).

A fin de realizar un examen más exhaustivo del taxón Salpas, se han determinado las ecuaciones potenciales de los modelos de regresión en función de la estación (Fig. 15). Se puede observar una mejora considerable en los valores de regresión para las

estaciones 51 y 78, con correlaciones similares, aunque pendientes muy diferentes. Por el contrario, este no es el caso de las otras dos estaciones, con curvas más asintóticas, presentando una alta dispersión en la estación 49 debido al pequeño volumen muestral. En el caso de la estación 77, es posible que requiera un mayor filtrado de los datos, con algunos valores que desplazan la curva disminuyendo la calidad del ajuste. Aun así, la significación aportada por valores muy pequeños del p-value avalan la relación entre las variables.

En comparación con los datos obtenidos por Lehet & Hernández-León (2009), la pendiente muestra un alto grado de disparidad con la determinada en dicho estudio para Salpas, con una ligera aproximación de la estación 78 únicamente ($b=0.78\pm0.07$ frente a $b=0.9633$ obtenido en este trabajo).

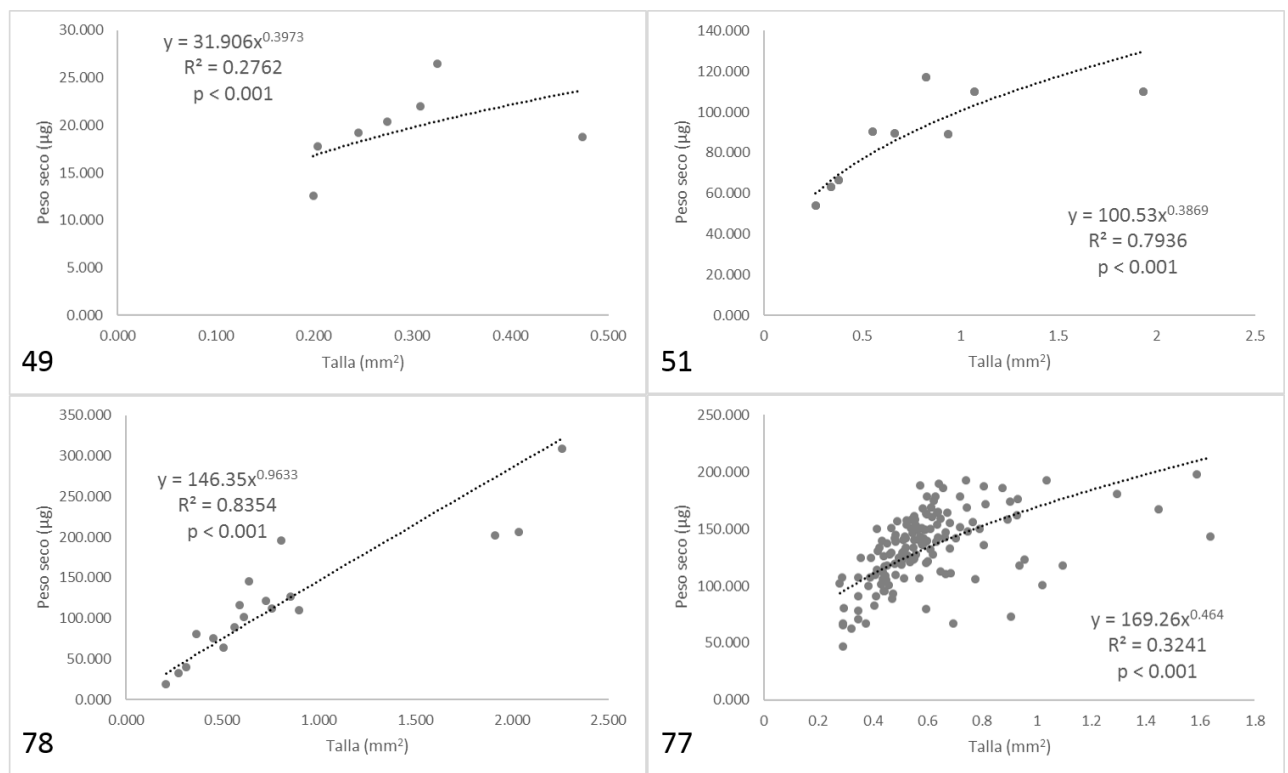


Figura 15. Representación gráfica de los modelos potenciales y sus valores de regresión de las distintas estaciones de muestreo (49, 51, 77 y 78) del taxón Salpas.

Categoría C

El empobrecimiento en la calidad y potencias de los ajustes lineales para los taxones englobados en esta categoría podría deberse al reducido número de individuos analizados de cada taxón. Un análisis en detalle determina que poseían tallas muy similares o por el contrario demasiado dispares para su pequeño número, resumiéndose en una elevada dispersión de los datos.

Categoría D

Los valores analíticos obtenidos para estos taxones no presentan ningún encarecimiento considerable de las características descritas para la categoría C. Podría decirse que es el caso contrario, ya que no poseen los volúmenes de muestra más bajos ni los rangos de tamaño son reducidos, pero sí que se puede observar que los datos también presentan una dispersión considerablemente elevada. Tanto para el caso de Clytemnestridae como de *Oithona*, se han obtenido R^2 muy bajos y p-values muy próximos a 1. Además, para el primero de ellos, la pendiente generada ha sido negativa, dato poco representativo respecto al crecimiento real de la tasa área-peso de estos organismos.

Por todo ello, queda de manifiesto que los resultados obtenidos para los taxones incluidos en las categorías C y D no serían válidos para realizar estimaciones de biomasa a partir de la metodología aplicada en este trabajo, quedando abierto a debate y futuros análisis.

5. CONCLUSIÓN

El proceso metodológico descrito ha proporcionado estimas representativas de la mayoría de taxones de zooplancton analizados. A partir de la toma de imágenes de muestras de zooplancton y su posterior análisis mediante softwares específicos, es posible determinar con exactitud la talla de los organismos. En conjunción con la metodología gravimétrica de peso seco, es posible establecer entonces una serie de relaciones con un alto grado de correlación ($R^2 > 0.8$ en el 29% de los modelos obtenidos; $R^2 > 0.6$ en el 48%) y significación (p-value < 0.001 para el 55% de los modelos; p-value < 0.05 para el 68%) entre las variables talla y peso. Los modelos que reflejan una mayor representatividad ($R^2 > 0.9$; p-value < 0.001) pertenecen a las especies Atlantidae, Limacinidae y *Pontellina plumata*.

En base a los resultados obtenidos, y gracias al propio diseño de la Expedición Malaspina 2010 de la que proceden las muestras, también se han podido llevar a cabo análisis intra e interespecíficos comparando los modelos construidos para diferentes especies de zooplancton. También ha sido posible estudiar las diferencias en los valores de regresión dependiendo de la procedencia biogeográfica de las muestras.

Se han podido comparar las pendientes de los modelos de regresión con antecedentes bibliográficos, obteniendo similitudes significativas con los datos presentados por Lehet & Hernández-León (2009) en el caso de Euphausiacea y Ostracoda. A partir de ello, se ha comprobado que los datos de estos taxones junto con Salpas y Quetognathos se ajustan mejor a modelos potenciales en vez de lineales, constituyendo la posibilidad de futuros análisis.

Las relaciones establecidas para las variables talla y peso permitirán revalorizar las estimaciones de biomasa de numerosos taxones de zooplancton procedentes de diferentes biotopos. Los factores de conversión calculados mediante modelos de regresión de las variables talla y peso, hacen posible estimar la biomasa del zooplancton de manera que se asegure la preservación de las muestras. Se establece por tanto una metodología no destructiva basada en el análisis de imagen que ofrece la posibilidad de comparar diferentes modelos, poblaciones o ejemplares y concurrir en sucesivos análisis ya que asegura la integridad estructural de los especímenes.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlstrom, E. H., & Thraillkill J. R. (1963). Plankton volume loss with time of preservation. *California Co-operative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 9:57-73.
- Alcaraz, M., Saiz, E., Calbet, A., Trepát, I., & Broglio, E. (2003). Estimating zooplankton biomass through image analysis. *Marine Biology*, 143(2), 307-315.
- Beers, J. R. (1976). Determination of zooplankton biomass. Zooplankton fixation and preservation. *Paris: UNESCO*. p 37-84.
- Bell, J. L., & Hopcroft, R. R. (2008). Assessment of ZooImage as a tool for the classification of zooplankton. *Journal of Plankton Research*, 30(12), 1351-1367.
- Benedetti, F., Jalabert, L., Sourisseau, M., Beker, B., Cailliau, C., Desnos, C., Elineau, A., Irrison, J. O., Lombard, F., Picheral, M., Stemmann, L., & Poulone, P. (2019). The seasonal and inter-annual fluctuations of plankton abundance and community structure in a North Atlantic Marine Protected Area. *Frontiers in Marine Science*, 6, 214.
- Benfield, M., Grosjean, P., Culverhouse, P., Irigoien, X., Sieracki, M., López-Urrutia, A., Dam, H., Hu, Q., Davis, C.S., Hanse, A., Pilskaln, C. H., Riseman, E. M., Schultz, H., Utgoff, P. E., & Gorsky, G. (2007) RAPID: research on automated plankton identification. *Oceanography*, 20, 172–187.
- Billones, R. G., M. L. M. Tackx, A. T. Flachier, L. Zhu, & M. H. Daro. (1999). Image analysis as a tool for measuring particulate matter concentrations and gut content, body size, and clearance rates of estuarine copepods: Validation and application, *J. Mar. Syst.*, 22, 179– 194.
- Böttger, R., & Schnack, D. (1986) On the effect of formaldehyde fixation on the dry weight of copepods. *Meeresforschung* 31:141–152.
- Castro-Longoria, E., Alvarez-Borrego, J., & Pech-Pacheco, J. (2001) Identification of species of Calanoid copepods using a new invariant correlation algorithm. *Crustaceana*, 74, 1029–1039.

- Colas, F., Tardivel, M., Perchoc, J., Lunven, M., Forest, B., Guyader, G., Danielou, M. M., Le Mestre, S., Bourriau, P., Antajan, E., Sourisseau, M., Huret, M., Petitgas, P., & Romagnan, J. B. (2018). The ZooCAM, a new in-flow imaging system for fast onboard counting, sizing and classification of fish eggs and metazooplankton. *Progress in oceanography*, 166, 54-65.
- Costello, J. H., Pieper, R. E., & Holliday, D. V. (1989). Comparison of acoustic and pump sampling techniques for the analysis of zooplankton distributions. *Journal of Plankton Research* 11:703-709.
- Edgerton, H. E. (1981). Electronic flash sources and films for plankton photography, *J. Biol. Photogr.* 49:25–26.
- Estep, K., MacIntyre, F., Hjørleifsson, E., & Sieburth, J. (1986) MacImage: a user-friendly image-analysis system, for the accurate mensuration of marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 33, 243–253.
- Freimann, R. (1996). *In situ* measurement of the zooplankton volume-frequency distribution by means of light scattering. *Continental Shelf Research* 16:421-434.
- Gorsky, G., & Grosjean, P. (2003). Qualitative and quantitative assessment of zooplankton samples. *GLOBEC Int. Newsletter*. 9:5–6.
- Gorsky, G., Ohman, M. D., Picheral, M., Gasparini, S., Stemann, L., Romagnan, J. B., Cawood, A., Pesant, S., García-Comas, C., & Prejger, F. (2010). Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. *Journal of plankton research*, 32(3), 285-303.
- Halliday, N. C. (2001) A comparison of morphometric and geometric methods for the estimation of individual zooplankton volumes. *Sarsia*, vol. 86, no 2, p. 101-105.
- Hernández-León, S., & Montero, I. (2006). Zooplankton biomass estimated from digitalized images in Antarctic waters: A calibration exercise. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 111(C5).
- Jenkins, C. A., Goes, J. I., McKee, K., Gomes, H. D. R., Arnone, R., Wang, M., Ondrusek, M., Nagamani, P. V., Preethi Latha, T., Rao, K. H. & Dadhwal, V. K. (2016). High-

resolution shipboard measurements of phytoplankton: a way forward for enhancing the utility of satellite SST and chlorophyll for mapping microscale features and frontal zones in coastal waters. *Remote Sensing of the Oceans and Inland Waters: Techniques, Applications, and Challenges* (Vol. 9878, p. 98780U).

Large, S. I., Fay, G., Friedland, K. D., & Link, J. S., (2015). Critical points in ecosystem responses to fishing and environmental pressures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 521, 1–17.

Le Borgne, R. (1975). E´quivalences entre les mesures de biovolume, poids secs, poids sec sans cendre, carbone, azote et phosphore du me´sozooplancton de l’Atlantique tropical. *Cah ORSTOM, Ser Oceanogr*, 13:179–196.

Lehette, P., & Hernández-León, S. (2009). Zooplankton biomass estimation from digitized images: a comparison between subtropical and Antarctic organisms. *Limnology and Oceanography: Methods*, vol. 7, no 4, p. 304-308.

Lombard, F., Boss, E., Waite, A. M., Vogt, M., Uitz, J., Stemmann, L., Sosik, H. M., Schulz, J., Romagnan, J. B., Picheral, M., Pearlman, J., Ohman, M. D., Niehoff, B., Möller, K. O., Miloslavich, P., Lara-López, A., Kudela, R., Lopes, R. M., Kiko, R., Karp-Boss, L., Jaffe, J. S., Iversen, M. H., Irisson, J. O., Fennel, K., Hauss, H., Guidi, L., Gorsky, G., Giering, S. L. C., Gaube, P., Gallagher, S., Dubelaar, G., Cowen, R. K., Carlotti, F., Briseño-Avena, C., Berline, L., Benoit-Bird, K., Bax, N., Batten, S., Ayata, S. D., Artigas, L. F., & Appeltans, W. (2019). Globally consistent quantitative observations of planktonic ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 6, 196.

Lovegrove, T. (1966). The determination of the dry weight of plankton and the effect of various factors on the values obtained. *Some contemporary studies in Marine Sciences*, p. 429-467.

Ortner, P. B., Hill, L. C., & Edgerton, H. E. (1981). In-situ silhouette photography of Gulf Stream zooplankton. *Deep-Sea Res.* 28A:1569–1576.

Ortner, P. B., Cumming, S. R., Aftring, R. P., & Edgerton, H. E. (1979). Silhouette photography of oceanic zooplankton. *Nature*, 277:50–51.

Pieper R.E. & Holliday D.V. (1984). Acoustic measurements of zooplankton distributions in the sea. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 41:226-238.

Postel, L., Fock, H., & Hagen, W. (2000). Biomass and abundance. *ICES zooplankton methodology manual*. Academic Press, p. 83-192.

Rolke, M., & Lenz, J. (1984). Size structure analysis of zooplankton samples by means of an automated image analyzing system. *J. Plankton Res.*, 6, 637–645.

Romagnan, J. B., Aldamman, L., Gasparini, S., Nival, P., Aubert, A., Jamet, J. L., & Stemmann, L. (2016). High frequency mesozooplankton monitoring: Can imaging systems and automated sample analysis help us describe and interpret changes in zooplankton community composition and size structure—An example from a coastal site. *Journal of Marine Systems*, 162, 18-28.

Romagnan, J. B., Legendre, L., Guidi, L., Jamet, J. L., Jamet, D., Mousseau, L., Pedrotti, M. L., Picheral, M., Gorsky, G., Sardet, C., & Stemmann, L. (2015). Comprehensive model of annual plankton succession based on the whole-plankton time series approach. *Plos One*, 10(3), e0119219.

Spohr, A. (1996). The macro-flow planktometer: evaluation of a procedure for the automated measurement of particulate matter in pelagic systems. *Archive of Fishery and Marine Research*, vol. 44, no 1-2, p. 141-157.

Strathmann, R. R. (1967). Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnol Oceanogr*, 12:411–418.

Wiebe, P., Boyd, S., & Cox J. L. (1975). Relationships between zooplankton displacement volume, wet weight, dry weight, and carbon. *Fish Bull*, 73:777–786.

Wiebe, P. (1988). Functional regression equations for zooplankton displacement volume, wet weight, dry weight, and carbon: a correction. *Fish. Bull.* 86:833–835.